

棉铃虫感觉神经元膜蛋白基因克隆和表达

苏宏华, 王桂荣, 张永军, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要:从棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 触角中克隆了一条全长 1 690 bp 的 cDNA 序列, 该序列阅读框全长 1 572 bp, 编码 523 个氨基酸残基, 序列中有 2 个跨膜区, 具有昆虫感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane protein, SNMP)的典型特征。SNMP 与已报道的其他昆虫的感觉神经元蛋白的氨基酸序列有很高的同源性。半定量 RT-PCR 研究结果显示, SNMP 在棉铃虫中不仅在触角中表达, 也在去掉触角的头、足中表达。但是在触角中的表达量最高, 在雌雄触角中的表达量差异不显著。在喙、下颚须和下唇须中也有表达。SNMP 在卵、蛹和成虫体内也都有表达, 但在卵中表达量相对较低。将 SNMP 编码区克隆到表达载体 pET21b 中, 成功地进行了原核表达, 表达出带有 6 个组氨酸标签的重组蛋白。

关键词:棉铃虫; 感觉神经元膜蛋白; 基因克隆; 半定量 RT-PCR; 原核表达

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)01-0007-07

Cloning and expression of sensory neuron membrane protein in *Helicoverpa armigera*

SU Hong-Hua, WANG Gui-Rong, ZHANG Yong-Jun, LIANG Ge-Mei, WU Kong-Ming, GUO Yu-Yuan*
(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: A full-length cDNA encoding sensory neuron membrane protein (SNMP) was cloned from antennae of *Helicoverpa armigera*. The open reading-frame of SNMP was 1 572 bp, encoding 523 amino acid residues. There were two putative transmembrane domains, which is the typical characteristic of SNMPs. And it also shared high identity with sensory neuron membrane proteins from other insects. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that SNMP was not only expressed in antennae, but also in head (excluding antennae) and legs of *H. armigera*. However, its expression in antennae was much higher than that in head and legs. There was no obvious difference between the expression in male antennae and that in female antennae. Moreover, it was also expressed in labial palpus, maxillary palpus and proboscis. SNMP was expressed in egg, the 10th-day pupa and imago, but expressed relatively low in egg. The SNMP coding region was cloned into the expression vector pET21b, and the recombinant SNMP protein with six-His tag was successfully expressed in the bacteria.

Key words: *Helicoverpa armigera*; sensory neuron membrane protein; gene cloning; semi-quantitative RT-PCR; prokaryotic expression

嗅觉在昆虫处理来自环境的化学信号过程中起着非常重要的作用, 从而使昆虫能够觅食, 寻找配偶、产卵场所、寄主、猎物以及发现捕食者。尤其是蛾类的信息素识别已经成为嗅觉接受和传导机制研究的模式(Jacquin-Joly *et al.*, 2000)。受体蛋白在嗅

觉受体神经元(ORN)的树突纤毛上表达, 气味分子与受体蛋白结合, 从而昆虫感受到气味。气味分子被水溶性气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)运送到气味受体。神经元、受体和 OBP 都位于毛状感器内。这些嗅觉感器分布于触角上, 是昆虫

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330410)

作者简介: 苏宏华, 女, 1975 年 9 月生, 辽宁朝阳人, 博士, 主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究, E-mail: suhjhjz@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 010-62894786; E-mail: yuyuanguo@hotmail.com

收稿日期 Received: 2006-04-07; 接受日期 Accepted: 2006-07-31

的嗅觉器官 (Rogers *et al.*, 2001a)。目前, OBP 和 ODE(气味降解酶)的具体作用, 以及这些蛋白与气味受体的相互作用还没有研究清楚。问题之一是: 气味分子和 OBP 的结合是否足够稳定以至于在生理相关的时间内气味分子不会从 OBP 上释放下来, 例如: 在 150 ~ 500 毫秒内, 信息素浓度的变化引发蛾类行为的改变 (Baker and Haynes, 1987; Baker and Vogt, 1988)。这个问题引发了另一个疑问: 是否存在某些次级机制, 使气味分子在气味受体 (OR) 附近区域从 OBP 上释放下来。感觉神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane protein, SNMP) 可能参与这一释放。SNMP 位于 ORN 受体膜上, 含量丰富, 已经在几种鳞翅目昆虫中得到鉴定 (Rogers *et al.*, 1997, 2001a, 2001b; Krieger and Ross, 2002)。SNMP 可能还有其他的功能, 但是这些蛋白的一些特征明确表明它们在气味识别过程中起非常重要的作用。SNMP 是触角特异性蛋白, 具有 2 个跨膜区域, 分别位于靠近 C-端和 N-端; 以及一个大的胞外环 (Rogers *et al.*, 1997, 2001a; Rasmussen *et al.*, 1998; Tabuchi *et al.*, 2000)。它不同于 7 个跨膜受体。SNMP 属于一个大的基因家族 CD36, 包括在其他昆虫和门已经鉴定的基因。SNMP (SNMP1) 在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 中最先被发现 (Rogers *et al.*, 1997); 然后相继在家蚕 *Bombyx mori*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 中被发现 (Vogt, 2003)。在烟草天蛾中也发现了 SNMP2 (Robertson *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2001a)。Jacquin-Joly 和 Francois 于 2003 年公布了棉铃虫感觉神经元膜蛋白基因序列 (GenBank 登录号: AF462067)。本文作者克隆了棉铃虫的 SNMP 基因, 对棉铃虫不同发育时期和不同组织中 SNMP 基因的表达进行了研究, 同时将该基因进行了原核表达。

1 材料与方法

1.1 供试材料和试剂

棉铃虫由本实验室用人工饲料饲养, 根据实验需要取不同发育时期和不同组织部位的材料。取喙、下颚须和下唇须等微小器官时, 需在解剖镜下操作。取前、中、后足共 3 对; 取前、后翅共 2 对。将取下来的样品放入固定在冰上的 1.5 mL 的离心管中, 样品全部取完后, 立即放在液氮中冷冻, 置 -70℃ 保存备用。

T-easy 载体购自 Promega 公司, 限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶和 Pyrobest 高保真酶及连接酶购自 TaKaRa 公司, pET21b 载体和 BL21 (DE3) 菌株均来自本实验室。

1.2 棉铃虫不同组织总 RNA 的分离和第 1 链 cDNA 的合成

根据 Wang 等 (2003) 方法, 用 Trizol 试剂 (Life Techniques 公司产品) 提取棉铃虫不同组织总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计定量总 RNA 的纯度和浓度。将不同组织、不同时期的总 RNA 稀释到 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 分别取 4 μL 进行反转录合成第 1 链 cDNA (Promega 反转录试剂盒 A3500)。

1.3 引物设计和合成

根据已报道的棉铃虫 SNMP 的核苷酸序列 (GenBank 登录号: AF462067), 利用 DNASIS 软件设计了 1 对特异性引物 (SNMP-F/SNMP-R) 用于扩增棉铃虫 SNMP 的全长阅读框。SNMP-F: 5'-TCGGTTCGACATGCAGCTGCCTAGAGAGCTG-3' (下划线表示 *Sal* I 酶切位点); SNMP-R: 5'-GTCGCGGCCGTATGTTACCTTAGCTGG-3' (下划线表示 *Not* I 酶切位点)。由于不容易直接扩增整个编码区, 所以先在 3'/5' 非编码区设计了 1 对引物 (snmp-1S/snmp-1A)。snmp-1S: 5'-CCCAACCTTCTTGAAACGC-3'; snmp-1A: 5'-GCAACCACAGACCACCATG-3'。第 3 对引物 (SenseSNMP/AntiSNMP) 用于半定量 RT-PCR 反应。SenseSNMP: 5'-GATCAAGACCAACCGTTAC-3'; AntiSNMP: 5'-AAGGAGACCATCCACCAAG-3'。选 18S rRNA 基因作为内参基因, 扩增该基因部分片段的引物为 18SS: 5'-TTAGTGAGGTCTTCGGACCG-3'; 18SR: 5'-CTTCCGCAGGTTCCCTACG-3'。引物在北京博亚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 产物的克隆、鉴定及序列测定

PCR 产物经电泳回收纯化后, 连接到 T-easy 载体上 (按 Kit 说明进行), 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取白色菌落, 培养后提取少量质粒。质粒提取参照 Sambrook 等 (1989) 方法。用 *Eco* R I 酶切鉴定重组阳性克隆。挑选含有目的片段的阳性克隆, 放入含有 Amp 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 LB 培养液振荡过夜, 碱法提取质粒, 采用 ABI377 全自动测序仪测序。

1.5 半定量 RT-PCR

半定量 RT-PCR 参考 Wang 等 (2004) 方法。取昆虫的触角 cDNA 为模板, 分别对内参基因 18S rRNA 基因和目标基因 SNMP 进行不同循环数的

PCR 实验,摸索每个基因的平台期。将棉铃虫不同时期不同组织的第 1 链 cDNA 稀释成不同浓度梯度的溶液,对 18S rRNA 基因进行扩增,确定棉铃虫不同时期和不同组织的内参基因表达量一致的 cDNA 浓度。以 1 μ L cDNA 为模板,加入 10 $\times$ ExTaq 缓冲液 5 μ L (含 Mg^{2+}),正向和反向引物 (SenseSNMP/AntiSNMP) 各 1 μ L (10 μ mol/L),内标基因 18S rRNA 的扩增引物各 1 μ L (18SS/18SR),2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μ L (5 U/ μ L),加水至 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,28 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。18S rRNA 和 SNMP 的 PCR 产物大小分别约 600 bp 和 468 bp。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 SNMP 的原核表达

以 1 μ L cDNA 为模板,加入 10 $\times$ Pyrobest 缓冲液 5 μ L (含 Mg^{2+}),正向和反向引物 (表达引物 SNMP-F/R) 各 1 μ L (10 μ mol/L),2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,Pyrobest 高保真酶 0.25 μ L (5 U/ μ L),加水至 50 μ L;设置 3 个重复。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

对 PCR 产物用 2 倍体积的乙醇,1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) - 20 $^{\circ}$ C 沉淀浓缩后,离心弃上清液,晾干,加入 30 μ L 水重新溶解。

利用 *Sal* I / *Not* I 对 SNMP PCR 产物和 pET21b 载体分别进行双酶切,切胶回收,然后用 T4 连接酶进行 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。将构建好的载体转化到 DH5 α 。挑取菌落,培养后参照 Sambrook 等 (1989) 的方法提取少量质粒,用 *Sal* I / *Not* I 酶切鉴定重组阳性克隆。挑选含有目的片段的阳性克隆。测序正确后,再将质粒转化到 BL21 (DE3) 中进行诱导表达。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 SNMP 基因的克隆和测序

以棉铃虫触角 cDNA 为模板,snmp-1S 和 snmp-1A 为引物进行扩增,电泳回收 1 500 ~ 1 700 bp 的片段 (图 1),与 T-easy 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,根据蓝白斑筛选阳性重组子,用 *Eco*R I 酶切进行鉴定,确定重组子中含有目的片段,然后进行测序,测序结果在 NCBI 上利用 BLAST 进行同源搜寻,结果表明一条 1 700 bp 左右的片段与昆虫的 SNMP 高度同源。

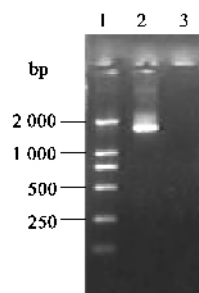


图 1 棉铃虫感觉神经元膜蛋白 SNMP 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of SNMP gene

in *Helicoverpa armigera*

1:DNA 标准 DNA marker DL2000;2:触角 cDNA 作为模板
cDNA from antennae as template;3:蒸馏水代替 cDNA 作为模板
Distilled water as template.

序列结果 (图 2) 显示该序列全长 1 690 bp,阅读框长 1 572 bp,编码 523 个氨基酸残基。属于 2 跨膜蛋白 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>):从第 9 个氨基酸到第 31 个氨基酸是第 1 个跨膜区;从第 459 个氨基酸到第 481 个氨基酸是第 2 个跨膜区。预测成熟蛋白分子量为 59.06 kD,等电点为 6.37。棉铃虫 SNMP 与已报道的其他昆虫的感觉神经元膜蛋白的氨基酸序列有很高的同源性 (图 3)。

2.2 棉铃虫 SNMP 基因的克隆和测序

为了明确 SNMP 在棉铃虫体内的时空表达,我们采用半定量 RT-PCR 对棉铃虫不同组织和不同发育时期 SNMP 的表达量进行了分析。结果显示:对内参基因分别进行了 26、28、30、32 和 34 个循环的扩增,发现 34 个循环以前都处于指数增长期,所以选择 28 个循环作为扩增 18S rRNA 的 PCR 循环数 (图 4);对目标基因 SNMP 分别进行了 28、30、32 和 34 个循环的扩增,发现 34 个循环以前都处于指数增长期,也选择 28 个循环作为扩增 SNMP 的 PCR 循环数 (图 5)。将内参基因在 28 个循环都调到了一样的亮度 (图 6)。本实验采用了同管扩增内参基因和目标基因。SNMP 在棉铃虫触角中表达量最高,其次在去掉触角的头和足中也有表达,但表达量显著低于触角中的表达量;SNMP 在雌雄蛾的触角上的表达量差异不显著 (图 7:A)。SNMP 在棉铃虫的卵、第 10 天的蛹和刚羽化的成虫中也有表达 (图 7:B)。为了确定 SNMP 在去掉触角的头中具体表达位置,又分别取喙、下颚须和下唇须。结果显示,SNMP 在喙 (图 7:C) 和下颚须、下唇须中都有明显表达 (图 7:D)。

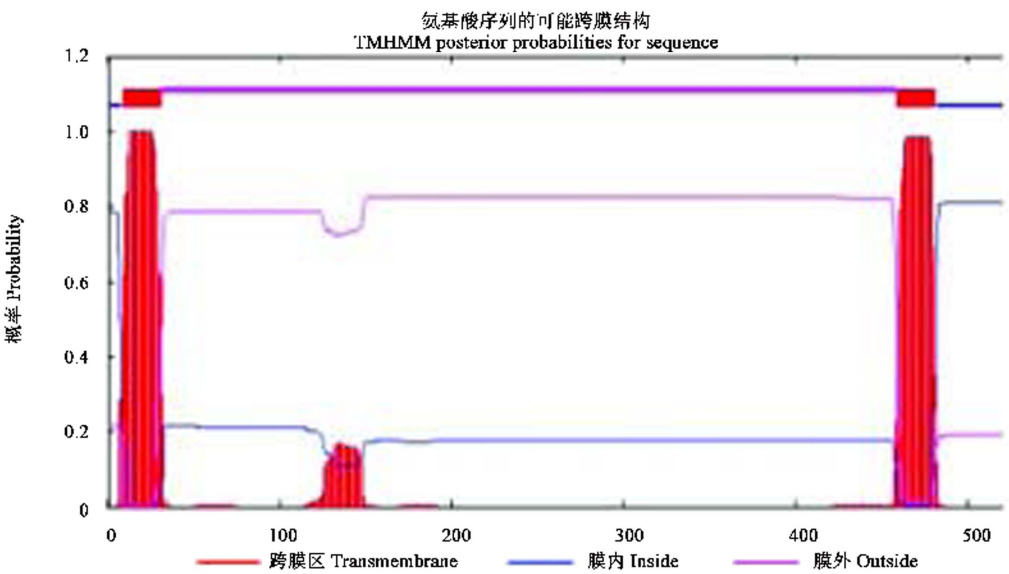


Fig. 2 Prediction of transmembrane region for SNMP in *Helicoverpa armigera*.
跨膜区 1(9 ~ 31), 跨膜区 2(459 ~ 481); 括号内数字表示组成跨膜区的氨基酸的位置。Transmembrane region 1 (9 - 31), Transmembrane region 2 (459 - 481); Numbers in the parenthesis stand for the amino acid position of transmembrane region.

SNMPPapol	ML LKPLKYAAIGGGVFFVFGILIGWVIFPVILKSQIKKEM	40
SNMPPHarm	MQLPRELKYAAIAGGVVALFGLIFGWVLFPTILKSQIKKEM	40
SNMPPMbra	ML LKPLKYAAIAGGVAVFGLIFGWVLFPPVILKGOIKKEM	40
SNMPPapol	ALSKKTDLRQMWEEKVFFALDFKVYEFNYTNVDEIQKGAKP	80
SNMPPHarm	ALSKKTDVRKMWEEKIPFALDFKVYEFNFTNAEEVQKGATP	80
SNMPPMbra	ALSKKTDVRKMWEEQIPFALDFKVYEFNYTNAEEVQKGAKP	80
SNMPPapol	IVKEIGPYVFEFWEKKEKVEVEDHEENDTITYKRLDWFHFRP	120
SNMPPHarm	IVKEIGPYVFEFWEKKEKVEVEDHEEDDTITYKRDVFFYFNP	120
SNMPPMbra	IVKEIGPYVFEFWEKKEKVEIEDHEEDDTITYKRRDAFYFNP	120
SNMPPapol	DLSSPGLTGEEVVIIMPHLFIILAMVATINREKPSMLNVVEK	160
SNMPPHarm	EMSAPGLTGEEIVVIPHIFMLGMALTWARDKPAMLNMVVGK	160
SNMPPMbra	EMSAPGLTGEEIVVIPHIFMLGMALTVERDKPAMLNMVVGK	160
SNMPPapol	SINGIFDNEPKDVFRLRVKAMDIMFRGLIINCERTEFAPKAA	200
SNMPPHarm	AMNGIFDDEPDIFLRVKALDILFRGLIINCARTEFAPKAT	200
SNMPPMbra	AMNGIFDSEPDIFMRVKALDILFRGLIINCARTEFAPKAT	200
SNMPPapol	CTKMKKDAVITGVLYEPNNQFRFSLFGTRNNTVNPEDVVTVK	240
SNMPPHarm	CTALKKEGVSGLVLEPNQFRFSLFGTRNNTDPHVITVK	240
SNMPPMbra	CTALKKEGVSGLVLEPNQFRFSLFGTRNNTDPHVITVK	240
SNMPPapol	RGIKNVMDVGVQVVALNKGKQIDIIWRDCENEFQGTDTGTVFP	280
SNMPPHarm	RGITSVMDVGVQVVAVDGKTEQTIWRDCENEFQGTDTGTVFP	280
SNMPPMbra	RGIKNVMDVGVQVVAVDGKTEQTIWRDCENEFQGTDTGTVFP	280
SNMPPapol	PFLTYKDRLEQSFSTDLCRSFKKWFQKKTSYKGIKTNRVIA	320
SNMPPHarm	PFVPEERIESFSTDLCRITFKPWYQKKTSYRGIKTNRYIA	320
SNMPPMbra	PFLTYNDRIQSFSTDLCRSFKPWYQKKTSYRGIKTNRYIA	320
SNMPPapol	NVGGFANDPELQCFCDTPDECLPKGIMDIRKCLKVPMPYVS	360
SNMPPHarm	NIGDFANDPELNCYCAKPDTCPPKGLMDLAPCMKAPMYAS	360
SNMPPMbra	NIGNFSDEPELHCFCDPDCKCPKGLMDLAPCIKAPMYAS	360
SNMPPapol	LPHFLETDTSVTNQVKGLTFDPNNEHGIADFEPLSGTLMMD	400
SNMPPHarm	MPHFLESDPALLSKVKGLNPDVTDQHGIRIDYEPITGTMPV	400
SNMPPMbra	MPHFLESDPALLNNVKGLNPDINQHGIRIDFEPISTGTPMV	400
SNMPPapol	AKQRNPNYIKLLRTDKIAIFKDLDPDSIVPCFVWHGILNL	440
SNMPPHarm	AKQRDQFNILQLLKTETKLDLFPKDLSCGDIVPLFWIDEGLAN	440
SNMPPMbra	AKQRDQFNILQLLKTETKIDLPKDLSCGDIVPLFWIDEGLAN	440
SNMPPapol	KTEVAKLKHQLFIPKRVVGVLRWNVVSFGSLGAVIGIVPH	480
SNMPPHarm	KTEVAKLKHQLFIPKRVVGVLRWNVVSFGSLGAVIGIVPH	480
SNMPPMbra	KTEVAKLKHQLFIPKRVVGVLRWNVVSFGSLGAVIGIVPH	480
SNMPPapol	FKDNIMGWAAGGESTTAKVNPEDGSNEQRGVSVIGQ.DRE	519
SNMPPHarm	FRDHIMRLAVSGDTKVSQVTPPEE..BEQKDISVIGQ.AQE	517
SNMPPMbra	FRDHIMRLAVSGDTKVSQVTPPEE.DPEQKDISVIGQPPAQE	519
SNMPPapol	PPKVTM	525
SNMPPHarm	PAKVNI	523
SNMPPMbra	PAKINI	525

图 3 棉铃虫 SNMP 氨基酸序列与 SNMP 家族其他蛋白氨基酸序列同源性比较
Fig. 3 Alignment of amino acid sequence of SNMP in *Helicoverpa armigera* with those of other proteins in the SNMP family
SNMPPHarm: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, GenBank 登录号 GenBank accession number AAO15604; SNMPPMbra: 甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*, AAO15603; SNMPPapol: 多音天蚕 *Antheraea polyphemus*, AAC47540.

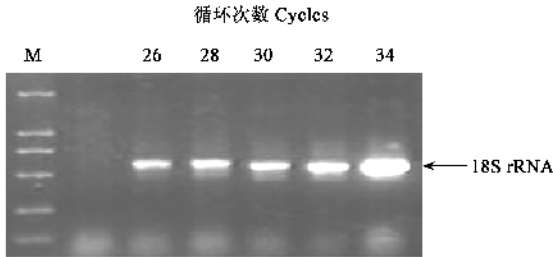


图 4 18S rRNA 不同循环次数(26、28、30、32 和 34 个循环)的 PCR 结果

Fig. 4 PCR products of 18S rRNA in different cycles (26, 28, 30, 32, and 34 cycles)

M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 图 5 同 The same for Fig. 5.

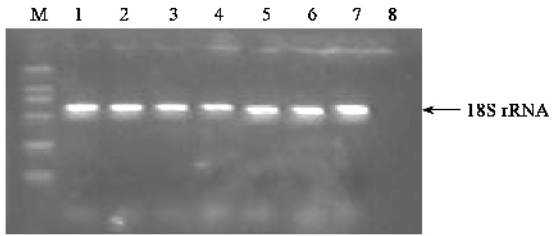


图 6 cDNA 样品的校准结果

Fig. 6 Normalizing the cDNA stock samples with 18S rRNA

M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 1 - 7 : 分别表示雌蛾触角、雄蛾触角、头、胸、腹、足、翅 Female antennae, male antennae, head, thorax, abdomen, legs and wing, respectively ; 8 : 不加模板的负对照 Without template.

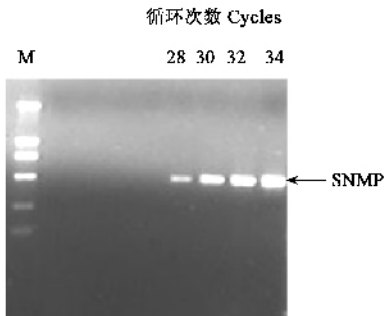


图 5 棉铃虫 SNMP 不同循环次数(28、30、32 和 34 个循环)的 PCR 结果

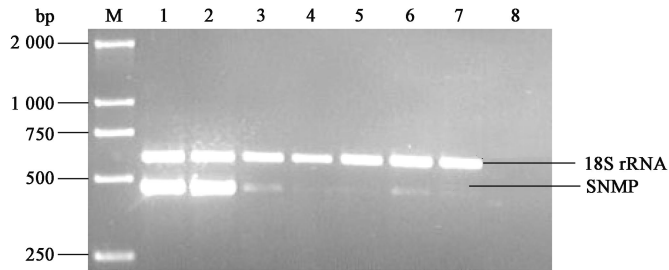
Fig. 5 PCR products of SNMP in *Helicoverpa armigera* in different cycles(28, 30, 32, and 34 cycles)

2.3 棉铃虫 SNMP 基因的原核表达

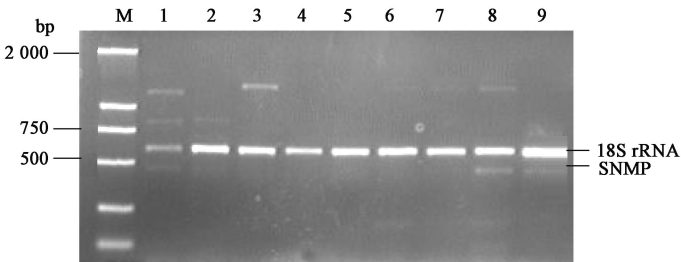
SNMP 的原核表达结果(图 8)表明：SNMP 只在包涵体中表达,在上清液中不表达。

3 讨论

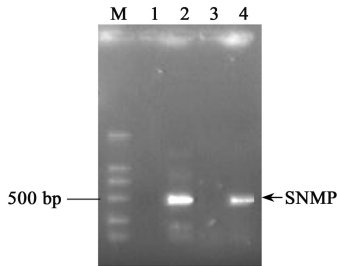
首次在多音天蚕体内发现 SNMP (SNMP1)，其研究方法是直接从昆虫触角中提取粗蛋白,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳,经过电泳转移后直接测序；



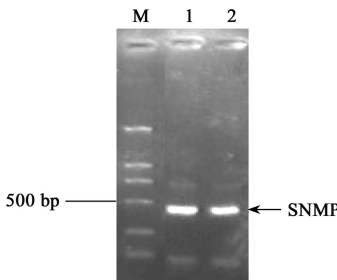
(A)



(B)



(C)



(D)

图 7 SNMP 在棉铃虫不同组织和不同发育时期的表达

Fig. 7 Expression of SNMP in different tissues and developmental stages of *Helicoverpa armigera*

(A) M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 1 - 7 : ♀ 触角、♂ 触角、♂ 去掉触角的头、♂ 胸部、♂ 腹部、♂ 足、♂ 翅 Female antennae, male antennae, head excluding antennae, thorax, abdomen, leg, and wing ; 8 : 不加模板的负对照 Without template. (B) M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 1 - 9 : 卵、1 龄幼虫、3 龄幼虫、5 龄幼虫、第 1 天蛹、第 4 天蛹、第 7 天蛹、第 10 天蛹和成虫 Egg, the 1st-instar larva, the 3rd-instar larva, the 5th-instar larva, the 1st-day pupa, the 4th-day pupa, the 7th-day pupa, the 10th-day pupa, and newly emerged imago, respectively. (C) M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 1 - 4 : ♀ 去掉触角和喙的头、♀ 喙、♂ 去掉触角和喙的头以及♂ 喙 Female head excluding antennae and proboscis, female proboscis, male head excluding antennae and proboscis, male proboscis, respectively. (D) M : DNA 标准 DNA marker DL2000 ; 1 - 2 : 下颚须和下唇须、♂ 下颚须和下唇须 Female labial palpus and maxillary palpus, male labial palpus and maxillary palpus, respectively.

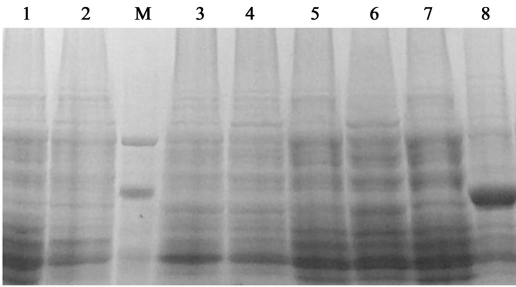


图 8 棉铃虫 SNMP 的原核表达

Fig. 8 Prokaryotic expression of SNMP of *Helicoverpa armigera*
M:低分子量蛋白标准 Protein marker of low weight; 1:空载体 pET21b(CK); 2:空载体经 1 mmol/L IPTG 诱导 pET21b induced by 1 mmol/L IPTG; 3:样品 A 细胞破碎后的上清液 Supernatant of sample A after sonication; 4:样品 A 细胞破碎后的沉淀 Pellet of sample A after sonication; 5:样品 B 细胞破碎后的上清液 Supernatant of sample B after sonication; 6:样品 B 细胞破碎后的沉淀 Pellet of sample B after sonication; 7:样品 C 细胞破碎后的上清液 Supernatant of sample C after sonication; 8:样品 C 细胞破碎后的包涵体 Inclusion body of sample C after sonication.

根据 N-端测序结果,设计简并的 PCR 引物;用³²P 标记的寡核苷酸探针筛选多音天蚕触角随机引物 cDNA 文库,从而得到目的基因 (Rogers *et al.*, 1997)。在家蚕和烟芽夜蛾中是通过用地高辛标记的 cDNA 探针筛选触角 cDNA 文库获得各自的 SNMP,所用的 cDNA 探针是根据多音天蚕 cDNA 的编码区设计的 (Krieger, 1993, 1996)。在烟草天蛾中是通过比对多音天蚕、家蚕、烟芽夜蛾的氨基酸序列,根据高度保守的氨基酸序列设计简并引物,通过 PCR 获得中间保守片段的基因序列,然后参考 Vogt 等 (1999) RACE PCR 技术获得 SNMP 全长基因。本研究中的棉铃虫 SNMP 全长基因是根据法国人克隆的序列 (GenBank 登录号: AF462067) 设计引物进行 PCR 获得的。

采用地高辛标记反义 RNA 探针,利用 Northern blotting 分析 SNMP 的时空表达情况,结果显示,SNMP 在多声大蚕的雌雄虫触角中都有表达,而在头、胸神经节、足、翅和肠中没有表达 (Rogers *et al.*, 1997, 2001a)。SNMP1-Msex 和 SNMP2-Msex 的 mRNA 在雌雄虫触角的量都很丰富,之间没有明显差异 (Rogers *et al.*, 2001a);而 SNMP-Apol 的 mRNA 在雌虫触角的量明显比雄虫触角的量丰富,利用 RNA 酶保护测验 (RPA) 了解组织定位结果也验证了这一事实 (Rogers *et al.*, 1997)。在家蚕和烟芽夜蛾中的表达情况还没有确定 (Vogt, 2003)。SNMP1-Msex 的 mRNA 在成虫羽化前 48 h 含量维持在一个较低的水平,在成虫羽化前大约 24 h 其含量急剧上升,刚羽

化和羽化后 24 h 的成虫 mRNA 含量水平相似 (Rogers *et al.*, 2001a)。RPA 结果显示,在多音天蚕 14 天的发育历期中,在发育第 6 天首次检测到 SNMP-Apol mRNA,但含量很低,持续增长到第 11 天,到 13.5 天时,含量显著增加,直到成虫阶段都维持在一个较高的水平 (Rogers *et al.*, 1997)。

SNMPs 是 CD36 家族中唯一在神经元中发现的基因,进而将这个基因家族的作用拓展到影响大脑功能和行为活动的范围 (Rogers *et al.*, 2001a)。SNMPs 有 2 个跨膜结构域,它们不同于具有 7 个跨膜结构域并且变异性很大的气味受体蛋白。但是,研究发现 SNMPs 在昆虫的气味识别中起着非常重要的作用。依据如下:(1)触角特异性表达;(2)在气味受体神经元上表达;(3)位于气味受体神经元的膜上;(4)不是在触角发育的分化时期表达,而是在气味感器发挥功能时期。例如:SNMP1-Msex 的表达起始于羽化前 36 h,然后持续到成虫阶段至少 24 h;而且,它的表达与其他的几种被认为参与气味识别的气味特异性蛋白,如 OBPs、PBP_s、ODE_s 及醛氧化酶 (AOX) 发生时间一致 (Rybczynski *et al.*, 1989, 1990; Vogt and Lerner, 1991; Vogt *et al.*, 1993)。

SNMP 在棉铃虫体内的空间表达情况与其在烟草天蛾和多声大蚕中的表达情况不一样。SNMP 在棉铃虫体内的空间表达情况表明:SNMP 不是触角特异性蛋白,它不仅参与棉铃虫的嗅觉识别,而且还参与棉铃虫的味觉识别。

迄今为止,已经克隆了鳞翅目 5 种昆虫共计 6 个 SNMP 基因。烟草天蛾中存在 2 个 SNMP 基因,对于 SNMP 基因的功能主要是通过基因的结构和分布进行预测,而能直接证明 SNMP 功能的研究很少。本研究已将棉铃虫 SNMP 在表达载体 pET21b 上表达并且进行了纯化,为研究该基因编码蛋白的空间结构及生理功能奠定了基础。

参考文献 (References)

- Baker TC, Haynes KF, 1987. Maneuvers used by flying male oriental fruit moths to relocate a sex pheromone plume in an experimentally shifted wind-field. *Physiol. Entomol.*, 12: 263 – 279.
- Baker TC, Vogt RG, 1988. Measured behavioral latency in response to sexpheromone loss in the large silk moth *Antheraea polyphemus*. *J. Exp. Biol.*, 137: 29 – 38.
- Jacquín-Joly E, Bohbot J, Francois MC, Cain AH, Nagnan-Le Meillour P, 2000. Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Mamestra brassicae*. *Eur. J.*

- Biochem.*, 267 : 6 708 – 6 714.
- Krieger J, Ganble H, Raming K, Breer H, 1993. Odorant binding proteins of *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 4 : 449 – 456.
- Krieger J, von Nickisch RE, Mameli M, Pelosi P, Breer H, 1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26 : 297 – 307.
- Krieger MJB, Ross KG, 2002. Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science*, 295 : 328 – 332.
- Rasmussen JT, Berglund L, Rasmussen MS, Petersen TE, 1998. Assignment of disulfide bridges in bovine CD36. *Eur. J. Biochem.*, 257 : 488 – 494.
- Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KK, Nardi JB, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol. Biol.*, 8 : 501 – 518.
- Rogers ME, Krieger J, Vogt RG, 2001a. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *J. Neurobiol.*, 49 : 47 – 61.
- Rogers ME, Steinbrecht RA, Vogt RG, 2001b. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Cell Tissue Res.*, 303 : 433 – 446.
- Rogers ME, Sun M, Lerner MR, Vogt RG, 1997. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 272 : 14 792 – 14 799.
- Rybczynski R, Reagan J, Lerner MR, 1989. A pheromone degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J. Neurosci.*, 9 : 1 341 – 1 353.
- Rybczynski R, Vogt RG, Lerner MR, 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 265 : 19 712 – 19 715.
- Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Tabuchi N, Akasaki K, Tsuji H, 2000. Two acidic amino acid residues, Asp (470) and Glu (471), contained in the carboxyl cytoplasmic tail of a major lysosomal membrane protein, LGP85/LIMP II, are important for its accumulation in secondary lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270 : 557 – 563.
- Vogt RG, 2003. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Academic Press. 392 – 445.
- Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24 : 481 – 495.
- Vogt RG, Lerner MR, 1991. Molecular cloning and sequencing of general-odorant binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta* : Comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *J. Neurosci.*, 11 : 2 972 – 2 984.
- Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.*, 22 : 74 – 84.
- Vogt RG, Rybczynski R, Cruz M, Lerner MR, 1993. Ecdysteroid regulation of olfactory protein expression in the developing antenna of the tobacco hawk moth, *Manduca sexta*. *J. Neurobiol.*, 24 : 581 – 597.
- Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33 : 115 – 124.
- Wang GR, Wu KM, Liang GM, Guo YY, 2004. Gene cloning, expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its CryIA binding region. *Science in China*, 34 : 537 – 546.

(责任编辑：黄玲巧)